

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ :	A1	(11) Número de publicación internacional:	WO 99/28436
C12M 1/34, G01N 35/10, 15/14, G06M 11/00		(43) Fecha de publicación internacional:	10 de Junio de 1999 (10.06.99)

(21) Solicitud internacional:	PCT/ES98/00303		
(22) Fecha de la presentación internacional:	11 de Noviembre de 1998 (11.11.98)		
(30) Datos relativos a la prioridad:	P 9702500 2 de Diciembre de 1997 (02.12.97) ES		
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):	FRANCISCO SORIA MELGUIZO, S.A. [ES/ES]; Caramuel, 38, E-28011 Madrid (ES).		
(72) Inventores; e			
(75) Inventores/solicitantes (sólo US):	NIETO VELASCO, Julio [ES/ES]; Caramuel, 38, E-28011 Madrid (ES). SORIA MELGUIZO, Francisco [ES/ES]; Caramuel, 38, E-28011 Madrid (ES). DOPICO PRIETO, Gervasio [ES/ES]; Caramuel, 38, E-28011 Madrid (ES).		
(74) Mandatario:	ROEB UNGEHEUER, Carlos; Paseo de la Castellana, 129, E-28046 Madrid (ES).		

(54) Title: SYSTEM FOR ANALYZING IMAGES PRODUCED BY BACTERIAL REACTIONS

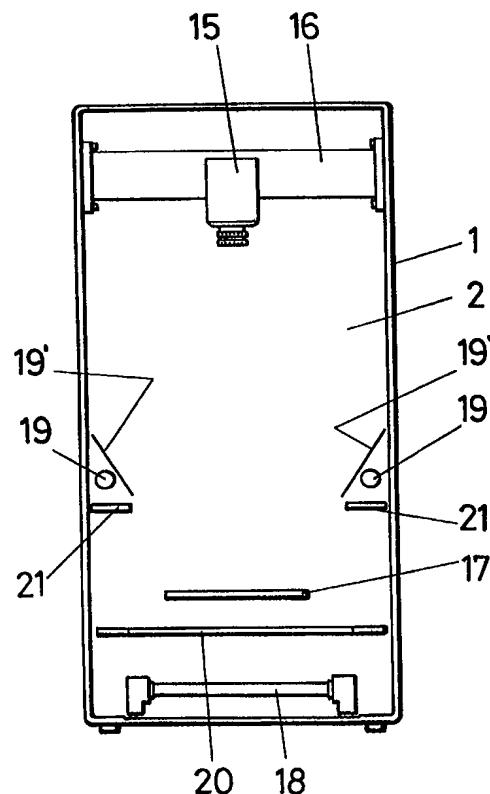
(54) Título: SISTEMA ANALIZADOR DE IMAGENES PRODUCIDAS POR REACCIONES BACTERIANAS

(57) Abstract

The system is based on an apparatus (1) forming a closed chamber (2) inside which is arranged a superior and centred digital camera (15) oriented towards a removable support (17) either a tray of wells wherein are situated the liquid cultivating means or a plate on which is placed a solid cultivating means; the support (17) is arranged between lower lighting means (18) and upper and lateral lighting means (19) and are completed with light diffusers (20 and 21). The apparatus is provided externally with operation indicators, switches and taps and connections which are intended to the proper operation and control via a central computer. The system captures and interprets the images produced by the reactions which take place in the referred liquid or solid cultivation means, thereby converting said bacterial reactions into values, as well as analyzing the growth of micro-organisms.

(57) Resumen

Se basa en un aparato (1) determinante de una cámara cerrada (2) en cuyo interior va dispuesta una cámara digital superior y centrada (15) orientada hacia un soporte extraible (17) sobre el que se dispone, bien un panel de pocillos en los que se sitúan los medios de cultivo líquidos, o bien una placa en la que se sitúa un medio de cultivo sólido, estando el soporte (17) situado entre unos medios de iluminación inferiores (18) y unos medios de iluminación superiores y laterales (19), complementados con difusores de luz (20 y 21). El aparato incluye externamente indicadores de funcionamiento, interruptores y tomas y conexiones adecuadas para el correcto funcionamiento y control a través de un ordenador central. El sistema captura e interpreta las imágenes producidas por las reacciones que ocurren en los medios de cultivo, líquido o sólido, referidos, permitiendo convertir las propias reacciones bacterianas en valores, así como analizar el crecimiento de los microorganismos.



UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benín	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

- 1 -

**SISTEMA ANALIZADOR DE IMÁGENES PRODUCIDAS POR
REACCIONES BACTERIANAS**

D E S C R I P C I Ó N

5

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a un sistema capaz de convertir imágenes de reacciones de bacterianas en valores numéricos, así como analizar el crecimiento de los microorganismos mediante la captura de la imagen de un panel o placa.

Es objeto de la invención llevar a cabo una captura e interpretación de las imágenes producidas por reacciones que ocurren, bien en medios de cultivo líquido contenidos en el interior de pocillos de paneles, o bien en la superficie de un medio de cultivo sólido contenido en recipientes de uso general en laboratorio, denominados placas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En los medios de cultivo líquidos se utilizan soportes constituidos por los comúnmente denominados paneles, que suelen ser de poliestireno y de forma rectangular, los cuales incluyen pocillos destinados a contener una variedad de los medios de cultivo microbiológico, sustratos bioquímicos, y/o agentes antimicrobianos, todos ellos en forma líquida, en los que se producen reacciones metabólicas cuya interpretación microbiológica conduce a la identificación de un microorganismo y/o a la determinación de su capacidad para ser neutralizado por uno o varios antibióticos.

35

Por otro lado, los cultivos se realizan también en otro tipo de soportes denominados placas y que son recipientes generalmente de poliestireno, de forma variable, los cuales contienen un único medio de cultivo sólido sobre el que se produce la reacción bacteriana.

Pues bien, tradicionalmente, en el caso de los paneles, en los laboratorios se inspeccionan visualmente las diferentes reacciones producidas en los distintos pocillos y en función de su forma y su color se determina la probabilidad del resultado mediante la oportuna consulta de tablas de uso general publicadas al efecto.

Actualmente se utilizan sistemas de lectura automática que, midiendo la densidad óptica de los pocillos, asignan un valor que es interpretado como positivo o negativo a través de un programa informático. Posteriormente, otro módulo informático determina la probabilidad del resultado mediante la combinación de la positividad de las reacciones parciales.

En el caso de las placas, tradicionalmente la aproximación al resultado es más rudimentaria, ya que el número de parámetros a considerar es menor, basándose éstos fundamentalmente en la cantidad, tamaño y color de las colonias bacterianas.

La ventaja de los sistemas automáticos descritos, que miden densidades ópticas, sobre el método tradicional de inspección visual, estriba en que se elimina la subjetividad del usuario en la interpretación de las reacciones, ya que cada reacción se traduce en un valor numérico.

Sin embargo, estos sistemas automáticos adolecen

de un serio problema e inconveniente, y es que no pueden interpretar las características morfológicas de las bacterias, ni sus pautas de crecimiento, por lo que escapan a su método de obtención de resultados de ciertos 5 elementos de importancia, como la forma del crecimiento bacteriano, que ha sido la base de obtención de resultados microbiológicos durante las últimas décadas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10

El sistema que se preconiza está concebido para resolver la problemática anteriormente expuesta, permitiendo convertir reacciones microbiológicas en valores numéricos que posteriormente son utilizados por 15 un software de diagnóstico para determinar, bien la cantidad de microorganismos presentes indicativos de infección, bien para la identificación del microorganismo presente en la muestra, bien para determinar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana del organismo causante.

20

Las reacciones que se identifican mediante el sistema de la invención son las siguientes:

25

- Tamaño, color, forma y cantidad de las colonias bacterianas.

- Desarrollo de color en pocillos con sustratos bioquímicos, indicativo del tipo de metabolismo bacteriano.

30

- Desarrollo en forma de botón o turbidez en pocillos con antibióticos, indicativo de la capacidad del microorganismo para desarrollarse en presencia de determinadas concentraciones de agentes antimicrobianos.

35

- Círculo alrededor de un disco con antibiótico, denominado "halo de inhibición".

Para ello, el sistema se basa en un aparato de configuración preferentemente prismático-rectangular, cuyo interior determina una cámara cerrada herméticamente con formas y dimensiones variables siempre que permitan una distancia focal adecuada entre la lente de una cámara digital y el panel o placa objeto de análisis. La cámara digital va montada interiormente sobre un soporte dispuesto superior y centradamente, mientras que en una zona próxima a la parte inferior del propio interior de la cámara va dispuesto un soporte asociado a un alimentador de entrada/salida para depositar en el mismo los correspondientes paneles o placas, o lo que es lo mismo los objetos a analizar en cada caso, con la particularidad de que los soportes son intercambiables y pueden ser de distintos tipos dependiendo de los paneles o placas a procesar.

20

En cada caso, el soporte en cuestión, situado en el interior de la cámara como se decía con anterioridad, tiene por función la de permitir el paso de luz, desde la parte inferior del objeto que se procesa o analiza, y la de centrado del mismo bajo la cámara digital.

Interiormente se incluye también un sistema de iluminación formado por cuatro tubos fluorescentes, dos de ellos instalados en los laterales, por encima del objeto a procesar, y los otros dos instalados por debajo del objeto a procesar, de manera que dependiendo del tipo de imagen a procesar se activarán los fluorescentes superiores, los inferiores o ambos, pudiendo ser la activación automática, a través del software que gestiona las distintas funciones, o manual mediante la operación

de un interruptor.

Exteriormente, en el correspondiente panel frontal de la cámara, se incluye una serie de indicadores led e 5 interruptores, para el control de sus funciones, así como los correspondientes mecanismos del alimentador para la introducción del panel o placa a procesar.

El panel posterior de la cámara incluye 10 externamente las correspondientes conexiones a un ordenador central, así como a una tarjeta TDM 436, y el propio suministro de corriente, tanto para la cámara digital como para el sistema de iluminación, sin perjuicio de que en función de necesidades de 15 operatividad del sistema pudieran instalarse otras conexiones o modificarse las citadas.

También cabe destacar el hecho de que en ese panel posterior se incluye una tapa de acceso para limpieza 20 interna, mantenimiento, sustitución de componentes, calibración, etc.

El sistema incluye además medios que posibilitan tanto la identificación del tipo de panel, como la 25 identificación de la información externa que se utiliza para complementar a las pruebas de identificación incluidas en el panel, así como para determinar la posición de cada pocillo en el panel y calcular la zona del mismo que se ha de utilizar para su lectura.

30

De acuerdo con las características descritas, el sistema en su funcionamiento debe realizar primeramente la correspondiente calibración de la cámara, mostrando ésta un histograma en la pantalla de un ordenador personal de control y unos valores de lectura, de manera 35

que una vez activado el indicador de que la lectura de calibración ha finalizado, se procederá ya a la lectura de un panel que se haya introducido en el soporte interno del alimentador, dividiendo la superficie superior del panel en tres áreas de información, una correspondiente al área de identificación del tipo de panel, otra correspondiente al área de información externa y otra correspondiente al área de pocillos.

Una vez activado en el software de control la correspondiente opción de lectura, se cierra el alimentador y se da la instrucción de lectura de la imagen, de manera que la información generada por el sistema es interpretada por el software que asigna a la bacteria analizada una clasificación taxonómica y una codificación como resistente o no a determinado antibiótico o grupo de antibióticos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra un representación externa y frontal del aparato o cámara que forma parte del sistema objeto de la invención.

La figura 2.- Muestra una vista externa, pero en este caso posterior, del mismo aparato o cámara representada en la figura anterior.

La figura 3.- Muestra una vista frontal en sección por un plano vertical del aparato o cámara representada en las dos figuras anteriores.

5 La figura 4.- Muestra una vista lateral, también en sección por un plano vertical, del mismo aparato o cámara de la figura anterior.

10 La figura 5.- Muestra una vista general y superior de un panel en donde aparecen las tres secciones de identificación correspondientes a: tipo de panel; información externa, y posición de cada pocillo.

15 La figura 6.- Muestra una vista en perspectiva de una forma de realización de un soporte para panel de pocillos.

20 La figura 7.- Muestra otra vista también en perspectiva superior de un soporte para placa.

La figura 8.- Muestra un detalle de la forma en que se realiza la selección del área de lectura según la posición de cada pocillo en el correspondiente panel.

25 La figura 9.- Muestra una vista en planta de una placa en la que se incluyen varios discos impregnados de una selección de antibióticos.

30 La figura 10.- Muestra, finalmente, la gráfica correspondiente al histograma de calibración.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

35 A la vista de las comentadas figuras, puede observarse cómo el sistema de la invención se basa en un

aparato con una carcasa general (1) de configuración prismático-rectangular, que interiormente define una cámara cerrada (2), con la particularidad de que en su panel frontal (3) incorpora externamente una serie de indicadores led (4) que indican las siguientes funciones:
5 el indicador (4a) corresponde al de entrada de corriente a la cámara (2); el indicador (4b) corresponde al de fin de calibración. Los tres siguientes indicadores (4c) corresponden al 25%, 50% y 75%, respectivamente, de la
10 lectura realizada, mientras que el indicador (4d) corresponde al de fin de lectura.

Asimismo, en ese panel frontal (3) se incluye el correspondiente alimentador (5), cuya función se expondrá con posterioridad, un botón de apertura (6) para accionamiento de aquél, un interruptor de contraste (7) y un interruptor general (8), de manera que tanto los indicadores (4) como los elementos (5 a 8) referidos,
15 constituyen los medios para el control de las funciones del sistema, así como para la introducción del panel o
20 placa a leer.

Por su parte, en el panel posterior (9) del aparato (1) se incluye una tapa (10) de acceso a los componentes internos, así como la toma de corriente (11) para sistemas de iluminación auxiliares; la toma de corriente (12) para una cámara digital que seguidamente se describirá; una toma o puerto de comunicaciones (13) con el ordenador central, así como las conexiones (14) a
25 un módulo TDM 436 en el que reside el programa de cálculo de conversión de señales colorimétricas de la imagen en valores numéricos, correspondiendo esas conexiones (14) a los colores azul, verde y rojo, indicando la señal correspondiente al tanto por ciento de esos colores o
30 señales colorimétricas.

En el interior de la cámara (2) se incluye la ya comentada cámara digital (15) montada sobre un soporte (16) situado superiormente, quedando la cámara (15) dispuesta centralmente y alineada con el centro de un soporte (17) sobre el que se colocará el objeto a analizar, concretamente el panel o placa correspondiente. El soporte (17) es intercambiable y podrá ser variable en su configuración, de acuerdo con el alimentador (5) y el tipo de paneles o placas que vaya a soportar. En cualquier caso, ese soporte (17) forma parte del propio dispositivo alimentador (5) y constituye el medio que permite la introducción desde el exterior de los soportes a procesar, es decir, de los paneles y placas, ya que la actuación sobre el botón de apertura (6) lleva consigo el desplazamiento del alimentador (5) y por lo tanto del soporte (17), guiándose sobre raíles y siendo accionado en su desplazamiento hacia afuera por cualquier sistema convencional, desde un simple muelle de empuje hasta utilizar mecanismo neumático o de cualquier otra índole.

20

En el interior de la cámara (2), además de la cámara digital (15) y soporte (17) referidos, se incluyen los correspondientes medios de iluminación constituidos por una pareja de fluorescentes (18) situados inferiormente y una pareja de fluorescentes (19) situados a una altura intermedia y lateralmente, complementándose esos fluorescentes (18) y (19) con respectivos difusores de luz (20) y (21), de manera que los primeros quedan por debajo del objeto a procesar, es decir, por debajo del soporte (17), mientras que los segundos quedan por encima, con la particularidad de que estos últimos se complementan con una placa de protección (19'), constitutiva de una pantalla metálica inclinada para impedir que sus radiaciones interfieran con la lectura de la cámara digital (15). Los difusores de luz (20) y (21)

- 10 -

son preferentemente de cristal blanco y están previstos para la distribución homogénea de la luz, en el primer caso sobre el objeto a procesar, y en el segundo caso a través de los pocillos de poliestireno transparentes del 5 panel o de la placa.

Dependiendo del tipo de imagen a procesar, se activarán los fluorescentes superiores (19), o bien los fluorescentes inferiores (18), o ambos simultáneamente, 10 pudiéndose llevar a cabo la activación de manera automática, a través del software que gestiona las distintas funciones, o manualmente mediante el accionamiento del interruptor de contraste (7) situado en el panel frontal (3).

15 En la figura 6 se muestra un soporte (17') para un panel de pocillos, soporte (17') que está afectado de los correspondientes orificios (22) para los pocillos del panel, así como con los rebajes (23) y (24) para la 20 iluminación del área de identificación del panel y para la iluminación del área de información externa, incluyendo también ese soporte (17') unos pivotes (25) de sujeción al correspondiente alimentador.

25 En la figura 7 se muestra un soporte (17'') para placas, contando con los pivotes (25) de sujeción al alimentador, así como con el orificio (26) para la iluminación inferior de la placa situada superiormente, y unas pestañas (27) de sujeción de la propia placa.

30 El funcionamiento del aparato es diferente según se pretenda analizar la imagen de un panel con sus reacciones bioquímicas y sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana que tienen lugar en distintas secciones 35 del mismo panel, o la imagen de una placa con crecimiento

de colonias y/o halos de inhibición.

En cualquier caso, previamente a la realización de una sesión de lecturas de un mismo tipo de producto, panel o placa, el aparato ha de ser calibrado, eligiendo para ello el soporte (17) que se va a utilizar que, a su vez está en función del panel o placa que se va a procesar.

Pues bien, una vez dispuesto el soporte (17), que como anteriormente se ha dicho puede tener la configuración mostrada en la figura 6 y referenciado con (17'), o bien la configuración representada en la figura 7 y referenciado con (17''), u otra configuración dependiendo del tipo de panel o placa, sin introducir ningún panel o placa para permitir de libre paso de luz a través de los orificios (22) ó (26) del soporte, se ejecuta la opción "calibrar" desde el software de control, que reside en un ordenador personal que se comunica con el aparato a través del ya comentado puerto de comunicaciones (13). Seguidamente, la cámara muestra en la pantalla del ordenador personal de control un histograma, que corresponde a la gráfica representada en la figura 10, y unos valores de lectura, a la vez que se activa el indicador (4b), indicativo de que ha finalizado la lectura de calibración.

Si la calibración está dentro de los rangos establecidos se da por finalizado este proceso, y en caso contrario se realizan los ajustes necesarios en la cámara (2).

El histograma que ofrece el sistema de acuerdo con la figura 10, deberá tener los picos de los extremos lo más próximos posible y el valle lo más cercano posible al

eje de abcisas.

La forma de realizar las lecturas es como sigue:

5 Cuando se trata de paneles, que como ya se ha dicho con anterioridad son soportes de poliestireno que contienen un número de pocillos en los que se incluyen sustratos bioquímicos que se emplean para identificar una bacteria y otros en los que se incluyen concentraciones
10 crecientes de agentes antimicrobianos que se utilizan para determinar la capacidad de dicha bacteria para ser combatida con la concentración más baja posible de antibiótico, se inicia poniendo en funcionamiento un algoritmo de lectura que divide la superficie (28) del
15 panel representado en la figura 5 en tres secciones correspondientes a las referencias (29), (30) y (31), de manera que la referencia (29) corresponde al área de identificación del tipo de panel, la referencia (30) al área de información externa, y la referencia (31) al área
20 de pocillos.

En el primer caso, y a través del área (29) se identifica, como se decía, el tipo de panel que se está usando (los hay de diferentes tipos según el
25 microorganismo, un grupo de microorganismos a que está destinado, o muestras de donde procedan). El área (29) está dividida en cuatro rectángulos, aunque podrían tener otra forma geométrica, estando preferentemente impresos en la parte superior izquierda del panel (28) (por ejemplo, si están llenos los rectángulos primero y tercero del área (29), indica que se trata de un panel para enterobacterias). Como es lógico la información sobre el tipo de panel es esencial para la interpretación del comportamiento de la bacteria frente a determinados
30 antibióticos.
35

En cuanto al área (30), prevista para identificar la información externa que se utiliza para complementar a las pruebas de identificación incluidas en el panel, incluye seis cuadrados, aunque también podrían tener otra forma geométrica, en los que el usuario marca con un punto que cubra, al menos, el 90% de su superficie, si la bacteria en cuestión ha sido positiva a una determinada técnica de laboratorio (por ejemplo, un punto cubriendo el primer cuadro de la parte superior, indica que el microorganismo ha dado cultivo, a las 18 horas, a la prueba de oxidasa).

En cuanto a la zona o área de pocillos (31), la misma determina la posición de cada pocillo en el panel y calcula la zona del mismo que se ha de utilizar para su lectura, generando cuatro valores para cada pocillo.

Como se ve en la figura 8, en la que la referencia (32) corresponde al foco de la cámara digital (15), los pocillos (33) son cilíndricos con la parte inferior o fondo (33') de configuración cónica, pudiéndose comprobar igualmente que la elección de la zona a considerar respecto a la vertical de la cámara digital que va instalada fija en la parte superior del aparato, es esencial para detectar el posible crecimiento bacteriano. En esa figura las referencias (34) corresponden al medio de cultivo líquido, y las referencias (35) a la zona de detección de crecimiento bacteriano, que en cada caso es diferente de acuerdo a la situación de el correspondiente pocillo (33) respecto de la vertical en la que se encuentra situado el foco (32) de la cámara digital.

De los cuatro valores generados por el sistema cuando procesa un panel, los dos primeros se utilizan para detectar reacciones colorimétricas causadas por el

metabolismo bacteriano, y corresponden al código de color y a la saturación de color, mientras que los valores tercero y cuarto se usan para detectar el propio crecimiento bacteriano, correspondiente al área de crecimiento 5 y a la cantidad de luz que atraviesa cada pocillo.

Los valores obtenidos para cada pocillo (33) son posteriormente tabulados por el software de control, a fin de determinar el microorganismo causante de la 10 infección y los antibióticos más idóneos, en su concentración más baja, para combatirlo.

En la figura 9 puede observarse una placa (36), que es un soporte circular de poliestireno, pudiendo 15 tener diferentes formas y tamaños, conteniendo un medio de cultivo sólido sobre cuya superficie se extiende una suspensión del microorganismo presunto causante de la infección.

Una vez inoculada toda la superficie con la suspensión bacteriana, se deposita sobre ella una selección de antibióticos en forma de discos (37) impregnados de ellos, de manera que el antibiótico contenido en un disco se disuelve en el medio de cultivo inoculado, 25 alrededor de éste, alcanzándose concentraciones más bajas de antibióticos en los puntos más alejados del borde del disco. En este figura 9, la zona referenciada con (38) es la zona de reconstrucción de perímetros por superposición de los "halos de inhibición" de dos de los discos (37).

La capacidad de un microorganismo para crecer 30 alrededor de un disco de antibiótico, y hacerlo en mayor, menor o ninguna medida, determina su calificación como sensible o resistente a dicho antibiótico y, por tanto, su utilidad como agente de elección para combatir la

infección.

El microorganismo forma alrededor de cada disco una zona circular que es la que anteriormente se denominó como "halo de inhibición" que es objeto de la medición del aparato.

Pues bien, una vez introducida la placa (36) en la cámara (2), y dada la orden de procesar la imagen, se pone en funcionamiento un algoritmo de lectura que divide la superficie en tantas secciones como discos depositados sobre el medio. A continuación comprueba que no existe superposición de halos, que es el fenómeno que se produce cuando dos discos próximos originan un halo de tal diámetro que ambos se solapan, de modo que si existe superposición el sistema reconstruye el halo más probable para cada uno, que es la zona (38) anteriormente referida.

Seguidamente se calcula el diámetro medio de cada halo de inhibición, partiendo de la medición directa del diámetro propiamente dicho, o de cualquier otro parámetro que nos lleve a la determinación del mismo. Para el cálculo del diámetro medio se realizan tres mediciones en cada halo, aunque también podría ser un número diferente.

Una vez realizadas las mediciones el sistema asocia cada medición a un disco (37), según el orden que ocupa en la placa (36), comenzando por el de la parte superior y siguiendo en sentido de las agujas del reloj.

Los valores obtenidos para cada disco (37) son posteriormente tabulados por el software de control a fin de determinar los antibióticos más idóneos para combatir al microorganismo causante de la infección.

- 16 -

Evidentemente, además de las lecturas de paneles y de placas de acuerdo con la descripción anteriormente realizada, se debe llevar a cabo un recuento de colonias que, como es obvio, consiste en contar el número de agrupaciones bacterianas que consiguen crecer sobre la superficie de un medio sólido, de manera que según el objeto de la invención, ese recuento de colonias se inicia mediante la técnica consistente en "sembrar" una suspensión bacteriana sobre la superficie de un medio contenido en una placa, incubarla a 37°C y determinar la cantidad de agrupaciones (colonias) que han aparecido tras un período de 18 a 14 horas de incubación.

El sistema, con los medios asociados al mismo, realizará una valoración del color del medio base sobre el que se inculó la suspensión, estando el valor numérico contenido entre 0 y 256.

Al respecto, una colonia considerada como la menor cantidad de pixels adyacentes que tienen una diferencia de color respecto al valor del medio base de un 20%, en más o en menos.

Pues bien, una vez determinada la superficie de una colonia, se extrae su superficie a todas las áreas donde el color tenga una diferencia del 20%, calculando seguidamente cuantas veces la superficie de una colonia está contenida en la superficie total, para finalmente llevar a cabo la tabulación del valor numérico obtenido, operación que se realiza mediante el software de control asociado al sistema, a fin de determinar si la cantidad de colonias sugiere la presencia, o no, de un proceso infeccioso.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, que estando previsto para convertir imágenes de reacciones microbiológicas en valores numéricos que posteriormente son utilizados por un software de diagnóstico para determinar: la cantidad de microorganismos presenten indicativos de infección; la identificación del microorganismo presente en la muestra, 5 y el patrón de susceptibilidad antimicrobiana del organismo causante, y en donde las reacciones que producen las imágenes que han de ser capturadas e interpretadas mediante el sistema propiamente dicho, ocurren en medios de cultivo líquidos contenidos en el 10 interior de pocillos de paneles, o en la superficie de un medio de cultivo sólido denominado placa, se caracteriza porque comprende un aparato (1) de configuración preferentemente prismático-rectangular, determinante en 15 su interior de una cámara cerrada y hermética (2), en la que se ha previsto internamente una cámara digital (15) montada sobre un soporte (16), un soporte extraíble (17) para el panel o placa de que se trate, unos medios de iluminación (18) y (19), complementados con difusores de 20 luz (20) y (21), mientras que externamente el aparato (1) 25 y en correspondencia con su panel frontal (3), incluye una serie de indicadores luminosos (4), un alimentador (5) al que está asociado el correspondiente soporte extraíble (17), un botón de apertura (6) para accionamiento del alimentador (5), un interruptor de 30 contraste (7) y un interruptor general (8); habiéndose previsto que en el panel posterior (9) de dicho aparato (1) se incluye una tapa (10) de acceso a los componentes internos, así como tomas (11), (12) y (13) para corriente de iluminación, corriente a la cámara y puerto de 35 comunicaciones con el ordenador central, respectivamente,

incluyendo también en ese panel posterior (9) conexiones (14) a un módulo de control TDM 436.

2^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, según reivindicación 1^a, caracterizado porque el soporte (17) va montado con carácter acoplable/desacoplable respecto al alimentador (5), guiándose éste en sus desplazamientos hacia el interior y hacia el exterior, para permitir la introducción del correspondiente panel de pocillo (28) o placa (36).

3^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte (17') para los paneles de pocillos (28) tendrá la configuración adecuada a la de dichos paneles, contando aquel con rebajes (23) y (24) en determinados laterales, así como con pivotes (25) de sujeción al alimentador (5) y orificios (22) para los pocillos (33) del correspondiente panel (18).

4^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, según reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque el soporte (17'') para la placa (36) cuenta con pivotes (25) de sujeción al alimentador (5) y un orificio (26) para el disco constitutivo de la placa (36), así como con pestañas (27) para la sujeción de tal placa.

30

5^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, según reivindicaciones 1^a, 2^a y 3^a, caracterizado porque en la superficie superior del panel (28) se determinan tres áreas (29), (30) y (31), la primera de ellas para la identificación del tipo de

- 19 -

panel, la segunda para la identificación de la información externa, y la tercera para la identificación de pocillo, correspondiéndose las áreas (29) y (30) con los rebajes (23) y (24) del soporte (17).

5

6^a.- Sistema analizador de imágenes producidas por reacciones bacterianas, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte (17) en el interior de la cámara (2) del aparato (1), queda situado por encima de los medios de iluminación que constituyen los fluorescentes (18), y por debajo de los medios de iluminación que constituyen los fluorescentes (19), situados aquellos en la parte inferior, mientras que los medios de iluminación o tubos fluorescentes (19) quedan dispuestos lateralmente a una altura intermedia, complementados ambos con los difusores de luz (20) y (21), a la vez de que los tubos fluorescentes (19) se complementan con una placas metálicas (19') que cortan el haz de luz que pudiera alcanzar el camino entre la cámara digital (15) situada superiormente y el panel situado sobre el soporte (17).

10

15

20

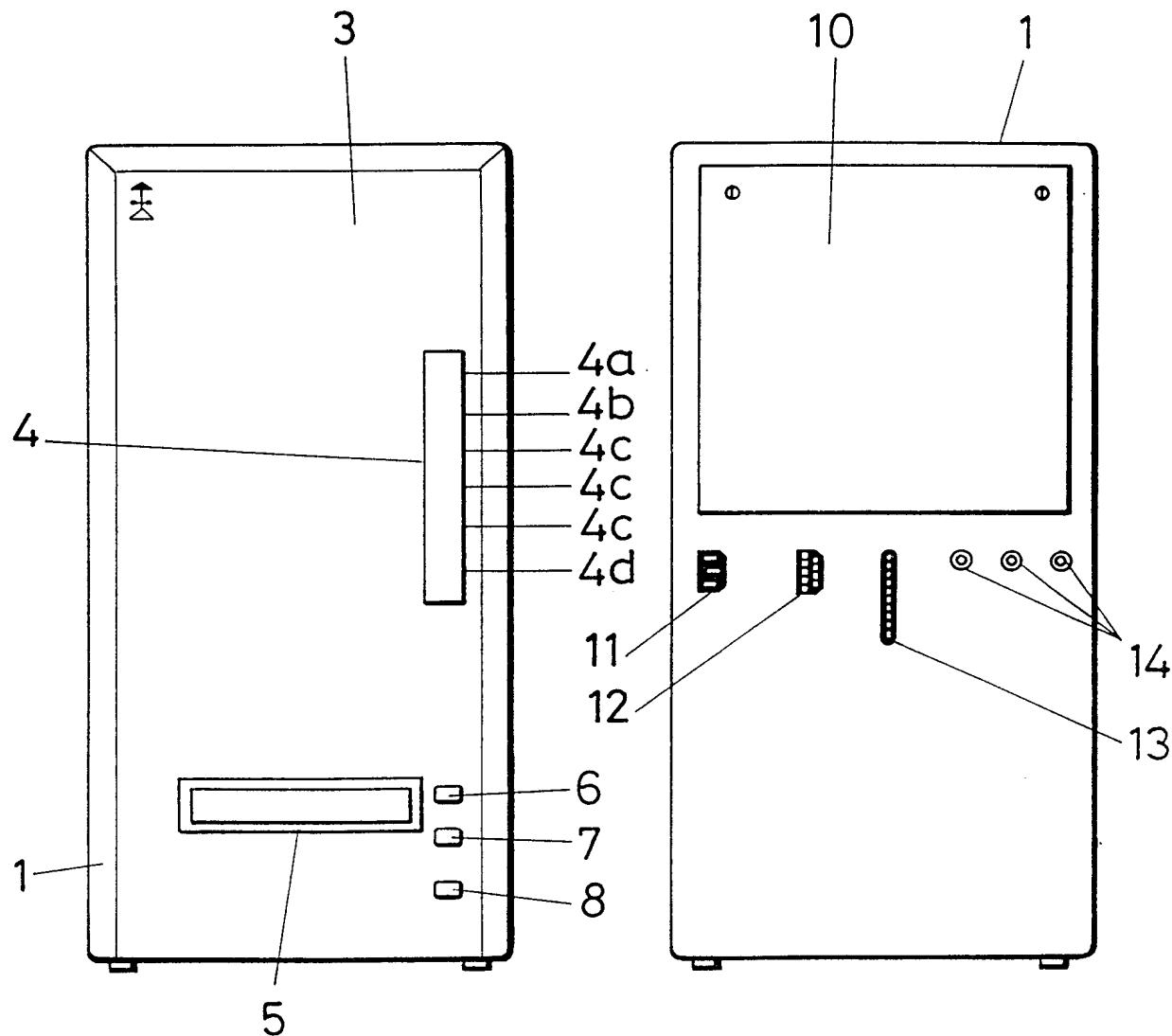


FIG.-1

FIG.-2

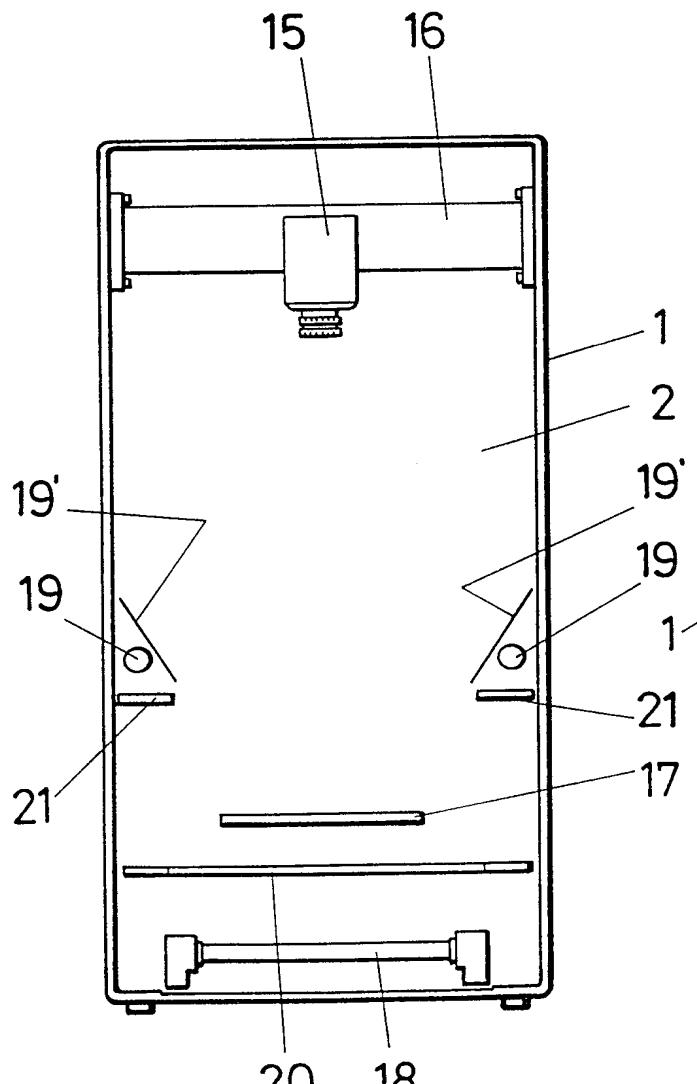


FIG.-3

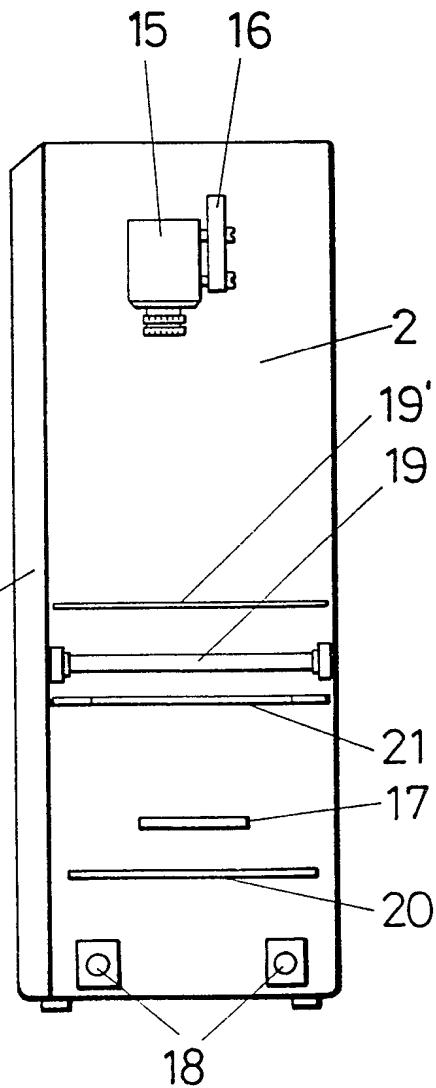
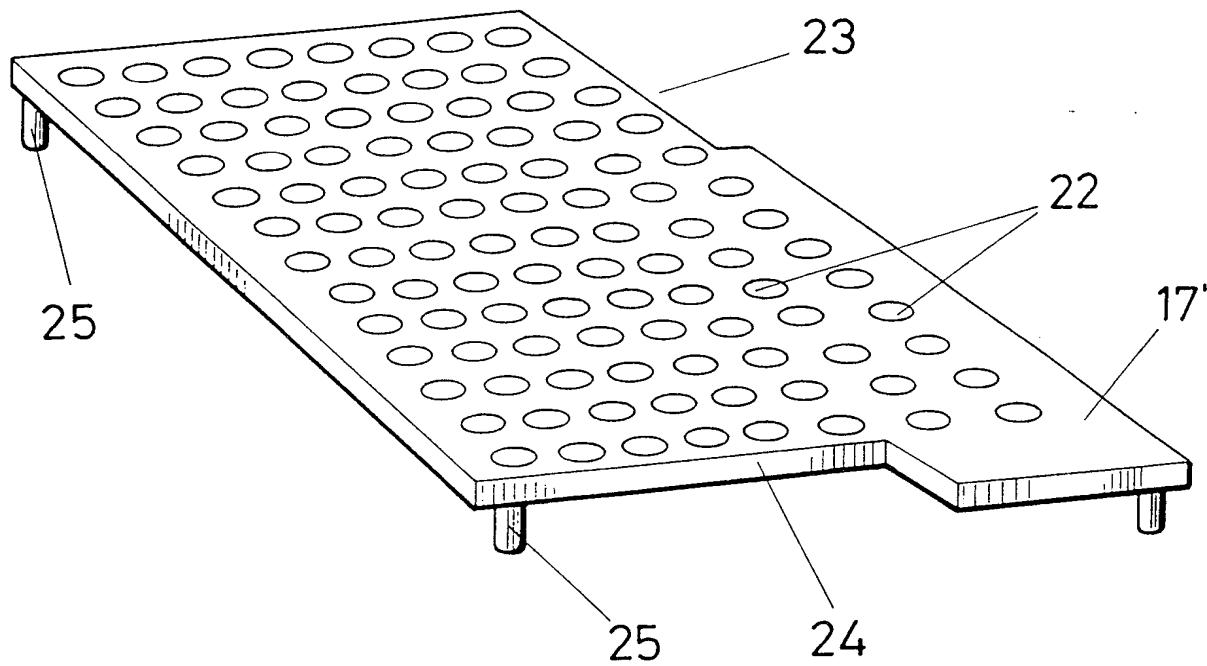
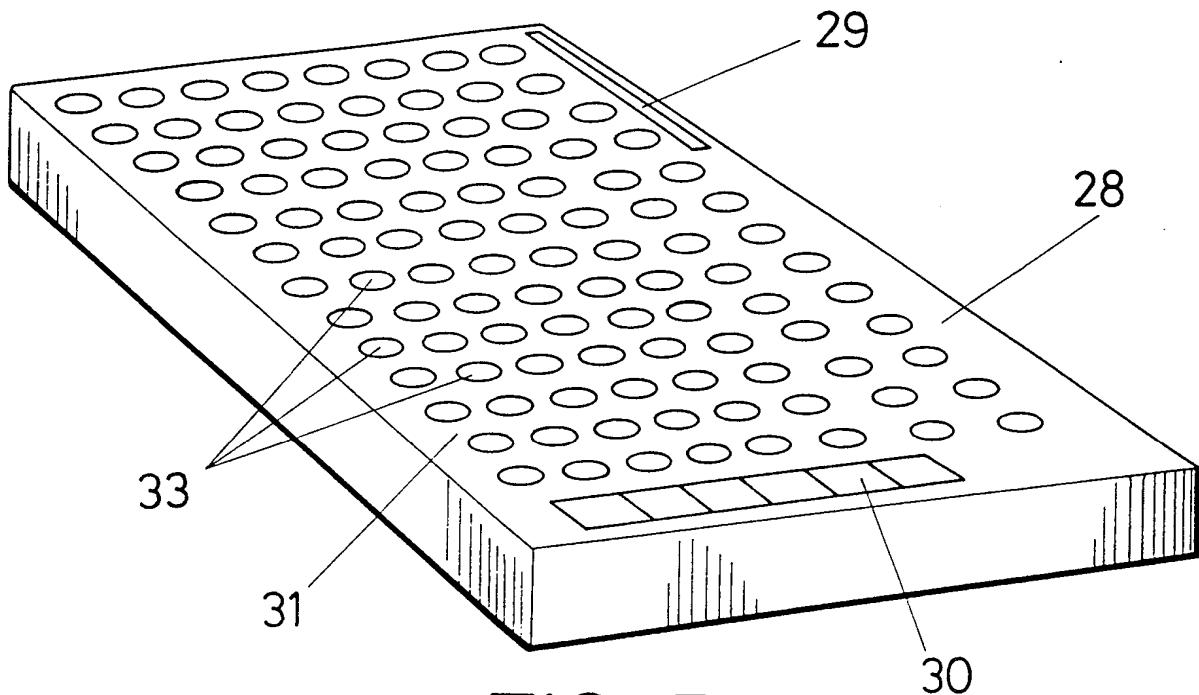


FIG.-4

3 / 5



4 / 5

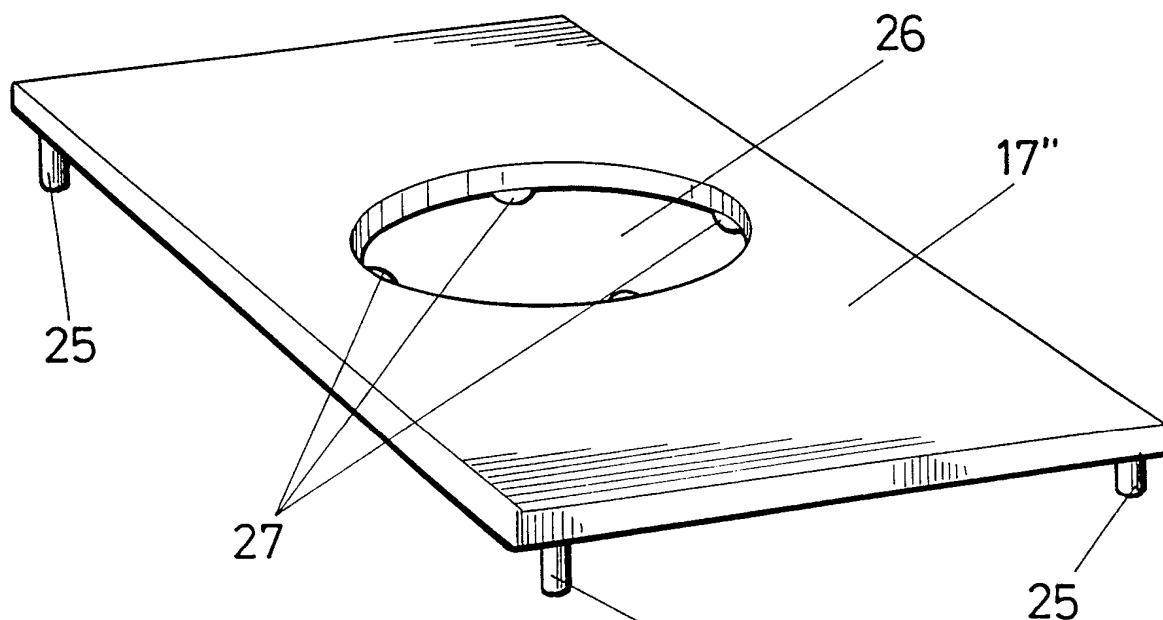


FIG.-7

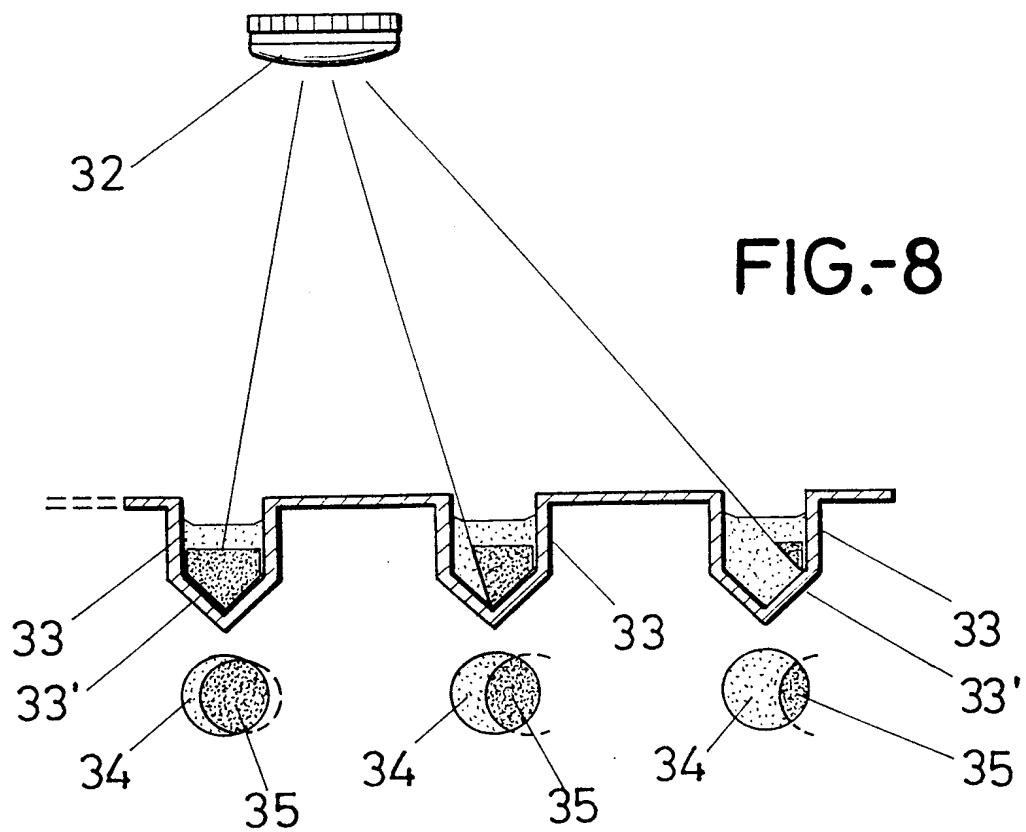


FIG.-8

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

5 / 5

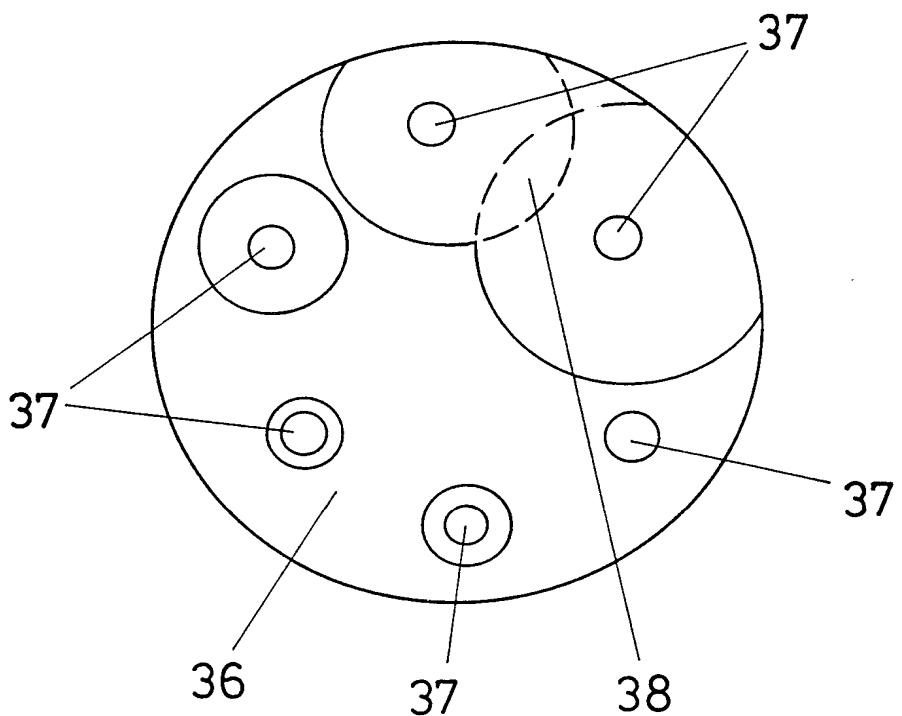


FIG.-9

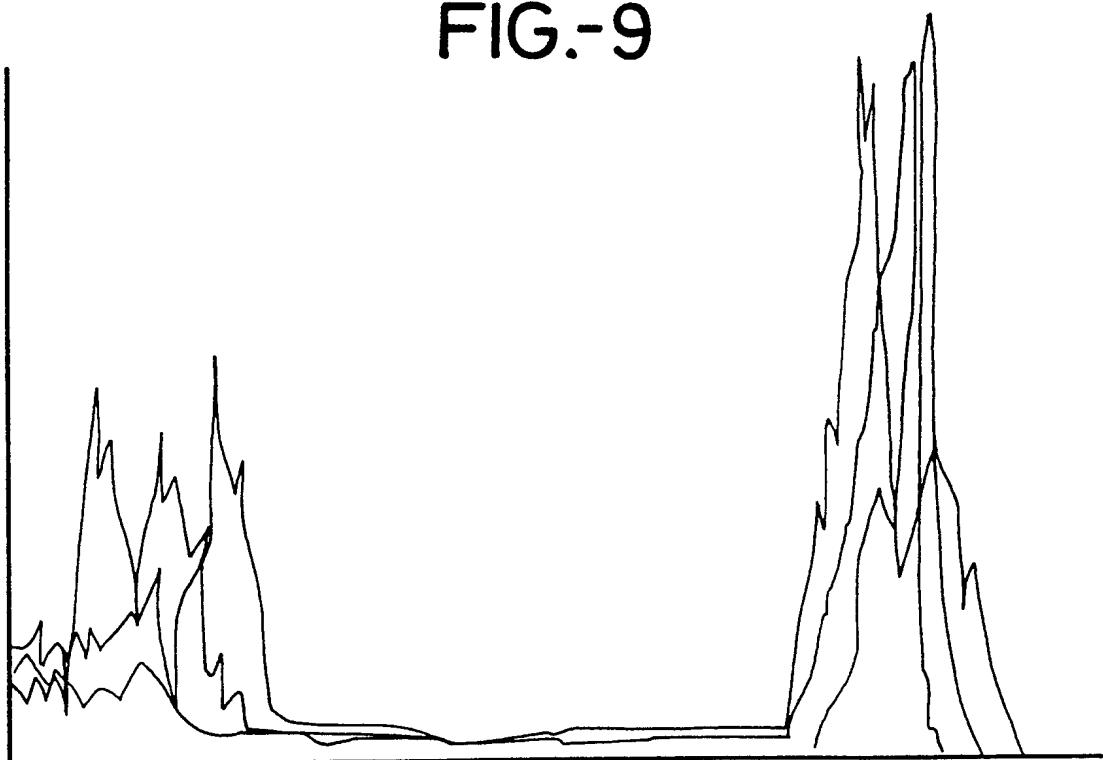


FIG.-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 C12M1/34 G01N35/10 G01N15/14 G06M11/00
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 C12M G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 16768 A (MINNESOTA MINING & MFG ; KREJCAREK GARY E (US); MACH PATRICK A (US) 22 June 1995 (22.06.95) see page 5, line 13 - page 7, line 26; figures 1,4,5 ---	1
A	WO 96 18721 A (MINNESOTA MINING & MFG) 20 June 1996 (20.06.96) see claims 1-8; figure 2 ---	1
A	WO 93 21511 A (COMBACT IMAGING SYSTEMS LTD ; UNIV RAMOT (IL); SCHORR KON BEN (GB)); 28 October 1993 (28.10.93) see page 4, paragraph 5 see page 9, paragraph 3 - page 10. paragraph 2 ---	1 -/-

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 1999 (11.02.99)

Date of mailing of the international search report

22 February 1999 (22.02.99)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00303

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 290 701 A (WILKINS JUDD R) 1 March 1994 (01.03.94) see abstract; figure 1 ---	1
A	EP 0 193 385 A (SHERWOOD MEDICAL CO) 3 September 1986 (03.09.86) ---	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 98/00303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9516768	A 22-06-1995	EP 0734435 A	JP 9509047 T	US 5744322 A	02-10-1996 16-09-1997 28-04-1998
WO 9618721	A 20-06-1996	NONE			
WO 9321511	A 28-10-1993	AU 3899393 A	CA 2117777 A	EP 0635126 A	18-11-1993 28-10-1993 25-01-1995
		JP 8511676 T			10-12-1996
US 5290701	A 01-03-1994	NONE			
EP 0193385	A 03-09-1986	US 4724215 A	US 4720463 A	CA 1273554 A	09-02-1988 19-01-1988 04-09-1990
		DE 3686067 A	JP 61247374 A	US 4856073 A	27-08-1992 04-11-1986 08-08-1989
		CA 1273555 A	JP 61247373 A	US 4817785 A	04-09-1990 04-11-1986 04-04-1989

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 98/00303

A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 6 C12M1/34 G01N35/10 G01N15/14 G06M11/00

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 6 C12M G01N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría ^a	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	WO 95 16768 A (MINNESOTA MINING & MFG ;KREJCAREK GARY E (US); MACH PATRICK A (US)) 22 Junio 1995 ver página 5, línea 13 - página 7, línea 26; figuras 1,4,5 ---	1
A	WO 96 18721 A (MINNESOTA MINING & MFG) 20 Junio 1996 ver reivindicaciones 1-8; figura 2 ---	1
A	WO 93 21511 A (COMBACT IMAGING SYSTEMS LTD ;UNIV RAMOT (IL); SCHORR KON BEN (GB);) 28 Octubre 1993 ver página 4. párrafo 5 ver página 9. párrafo 3 - página 10. párrafo 2 --- -/-	1

En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

11 Febrero 1999

22.02.99

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Tabellion, M

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 98/00303

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoríaº	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	US 5 290 701 A (WILKINS JUDD R) 1 Marzo 1994 ver resumen; figura 1 ----	1
A	EP 0 193 385 A (SHERWOOD MEDICAL CO) 3 Septiembre 1986 -----	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 98/00303

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación
WO 9516768 A	22-06-1995	EP	0734435 A		02-10-1996
		JP	9509047 T		16-09-1997
		US	5744322 A		28-04-1998
WO 9618721 A	20-06-1996	NINGUNO			
WO 9321511 A	28-10-1993	AU	3899393 A		18-11-1993
		CA	2117777 A		28-10-1993
		EP	0635126 A		25-01-1995
		JP	8511676 T		10-12-1996
US 5290701 A	01-03-1994	NINGUNO			
EP 0193385 A	03-09-1986	US	4724215 A		09-02-1988
		US	4720463 A		19-01-1988
		CA	1273554 A		04-09-1990
		DE	3686067 A		27-08-1992
		JP	61247374 A		04-11-1986
		US	4856073 A		08-08-1989
		CA	1273555 A		04-09-1990
		JP	61247373 A		04-11-1986
		US	4817785 A		04-04-1989